

# Nghiên cứu tăng cường khả năng sinh astaxanthin ở nấm men *Rhodospiridium toruloides* sử dụng tác nhân gây đột biến benomyl và đánh giá hoạt tính bắt gốc tự do ABTS của astaxanthin

Trần Thị Tuyết Nhung<sup>1,2</sup>, Ngô Đại Nghiệp<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Khoa học Ứng dụng, Trường Đại học Tôn Đức Thắng, 19 Nguyễn Hữu Thọ, phường Tân Phong, quận 7, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 29/11/2022; ngày chuyển phản biện 3/12/2022; ngày nhận phản biện 28/12/2022; ngày chấp nhận đăng 10/1/2023

## **Tóm tắt:**

Astaxanthin là một xanthophyll carotenoid, có giá trị về mặt kinh tế khi được dùng làm chất tạo màu trong thực phẩm cũng như ứng dụng trong y dược. Nghiên cứu này sử dụng tác nhân ngẫu nhiên là chất diệt nấm benomyl để tăng cường sinh tổng hợp astaxanthin từ chủng nấm men *Rhodospiridium toruloides*. Benomyl đã cho hiệu quả gây đột biến tăng cường sinh astaxanthin ở các nồng độ thử nghiệm. Trong số các chủng đột biến được sàng lọc, chủng nấm men đã đột biến B18 (1138,51 µg/l) cho khả năng tích lũy astaxanthin cao hơn 3,1 lần so với chủng bố mẹ. Chủng B18 có thời gian pha lag ngắn khoảng 5 giờ nuôi cấy và đi vào pha cân bằng sau 33 giờ, kéo dài trong 30 giờ và vào pha suy tàn sau 63 giờ lên men. Sau 96 giờ lên men là thời điểm hàm lượng astaxanthin tích lũy cao nhất, đạt 1138 µg/l. Kết quả thể hiện cao chiết astaxanthin thu được từ chủng B18 đột biến có khả năng dập tắt gốc tự do 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ( $IC_{50}=8,531$  µg/ml) cao gấp 6,2 lần so với vitamin E.

**Từ khoá:** astaxanthin, benomyl, *Rhodospiridium toruloides*, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

**Chỉ số phân loại:** 1.6, 2.8

## Study on the effect of benomyl on the ability to enhance astaxanthin production of *Rhodospiridium toruloides* and evaluate the free radical scavenging activity ABTS of astaxanthin

Thi Tuyet Nhung Tran<sup>1,2</sup>, Dai-Nghiep Ngo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, 227 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University, 19 Nguyen Huu Tho Street, Tan Phong Ward, District 7, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 29 November 2022; revised 28 December 2022; accepted 10 January 2023

## **Abstract:**

Astaxanthin is a xanthophyll carotenoid and it has economic value when it has been used as a colorant in food as well as when applied in medicine. This work aimed to attain *Rhodospiridium toruloides* mutants for enhanced astaxanthin accumulation using a benomyl agent. Benomyl treatment was shown to be efficient at different investigated concentrations for enhanced astaxanthin production of yeast. Among the screened mutants, B18 (1138.51 µg/l astaxanthin content) exhibited the highest astaxanthin production which was 3.1 times higher than that of the wild type. Mutant strain B18 consists of four phases including a lag phase of about 5 hours, 33 hours of log phase, 30 hours of stationary phase and a death phase after 63 hours of inoculation. The highest accumulated astaxanthin was 1138 µg/l after 96 hours of inoculation. The results showed that the scavenging capacity of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) - ABTS free radicals from the crude extract of astaxanthin from mutant strain B18 with  $IC_{50}=8.531$  µg/ml was 6.2 times higher than that of vitamin E.

**Keywords:** astaxanthin, benomyl, *Rhodospiridium toruloides*, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

**Classification numbers:** 1.6, 2.8

\*Tác giả liên hệ: Email: ndnghiep@hcmus.edu.vn

## 1. Đặt vấn đề

Astaxanthin là một sắc tố màu đỏ cam, thuộc nhóm xanthophyll carotenoid và được sinh tổng hợp bởi nhiều loại vi tảo, vi khuẩn và nấm, cũng như tích lũy trong các sinh vật biển như cá hồi, tôm, cua và nhuyễn thể [1]. Astaxanthin được sử dụng nhiều để làm thức ăn nuôi cá và động vật giáp xác, loại astaxanthin này thường được tổng hợp hoá học hoặc sử dụng công nghệ sinh học để tạo ra [2]. Tuy nhiên, astaxanthin từ nguồn tự nhiên được ưa chuộng hơn vì mang tính an toàn cao hơn khi ứng dụng làm chất phụ gia thực phẩm, đồng thời tăng khả năng hấp phụ của động vật chủ [3]. Gần đây ứng dụng của astaxanthin trong các ngành dược lý và y học đang nhận được nhiều sự quan tâm, nhờ vào hoạt tính sinh học tiềm năng của hợp chất bao gồm kháng oxy hóa mạnh, kháng viêm, ngăn ngừa tiểu đường, ngăn các bệnh về tim mạch, chống ung thư... [4, 5].

Vi tảo *Haematococcus pluvialis*, hay còn gọi là vi tảo xanh, là nguồn thu nhận chính của astaxanthin phục vụ tiêu dùng của con người và có tiềm năng lớn nhất về cung cấp astaxanthin trong các nguồn được đề xuất [6]. Astaxanthin cũng được tìm thấy trong nấm men *Xanthophyllomyces dendrorhous* (tên gọi trước đây là *Phaffia rhodozyma*), trong thực vật, một số loại nấm *Chlorococcum* sp., *Chlorella zofingiensis* và vi khuẩn biển *Agrobacterium aurantiacum* [7, 8]. Hiện nay, nhu cầu sử dụng astaxanthin trong các ngành công nghiệp khác nhau như nuôi trồng thủy sản, mỹ phẩm, thực phẩm, dinh dưỡng và dược phẩm ngày càng tăng cao. Tuy nhiên các loài vi sinh vật kể trên đều có những hạn chế nhất định trong ứng dụng công nghiệp như đòi hỏi chi phí cao kỹ thuật nuôi cấy và tăng trưởng chậm của tế bào. *R. toruloides* là nấm men có thể dùng lignocellulose làm cơ chất để lên men và có khả năng sinh tổng hợp carotenoid [7, 8]. Nấm men *R. toruloides* được công bố là đối tượng sinh carotenoid nhiều tiềm năng do có thể sử dụng các nguồn carbon phế phẩm như lignocellulose để sinh trưởng và phát triển nhanh [6, 9]. Nhưng chủng *R. toruloides* hoang dại lại bị hạn chế trong ứng dụng ở quy mô công nghiệp do cho hàm lượng tích lũy astaxanthin thấp. Vì vậy việc nghiên cứu tạo chủng đột biến tăng cường sinh tổng hợp astaxanthin của chủng *R. toruloides* có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

Trong phạm vi nghiên cứu này, benomyl được sử dụng là tác nhân để gây đột biến trên chủng nấm men *R. toruloides* nhằm thu nhận và sàng lọc chủng đột biến tăng sinh tổng hợp astaxanthin so với chủng *R. toruloides* ban đầu được phân lập từ D.N. Ngo và cs (2014) [10]. Ngoài ra, cao chiết thô astaxanthin cũng được thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Nấm men *R. toruloides* chủng gốc được phân lập từ D.N. Ngo và cs (2014) [10], giống được lưu trữ trong glycerol 20% ở nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$  tại Phòng thí nghiệm Bộ môn Sinh hóa, Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh. Các chủng nấm men đột biến được thu nhận, sàng lọc và lựa chọn ngẫu nhiên dựa trên màu sắc của khuẩn lạc so với màu sắc của chủng nấm men phân lập ban đầu.

Môi trường Hansen lỏng dùng để nuôi cấy và nhân giống *R. toruloides* có pH 6 và gồm các thành phần: 50 g/l glucose, 10 g/l peptone, 3 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  và 3 g/l  $\text{MgSO}_4$ . Tỷ lệ giống bổ sung là 5% ở mỗi lần nhân giống 100 ml, nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ phòng ( $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) trong 96 giờ.

### 2.2. Sàng lọc và tuyển chọn chủng nấm men *Rhodospiridium toruloides* đột biến bằng tác nhân benomyl

Tiến hành nuôi cấy nấm men đến mật độ tế bào khoảng  $10^8$  tế bào/ml rồi xử lý với benomyl gây đột biến [11]. Dịch huyền phù tế bào (1 ml) được ủ với benomyl ở các nồng độ khác nhau: 5; 2; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 và 0,005 mg/ml, vortex nhẹ, sau đó ủ lắc trong 60 phút. Dịch huyền phù tế bào sau xử lý với tác nhân benomyl (100  $\mu\text{l}$ ) được pha loãng ở nồng độ  $10^{-3}$  và cấy trang trên đĩa có môi trường thạch Hansen và ủ ở nhiệt độ  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 7 ngày (điều kiện tránh sáng). Đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên các đĩa petri để tính toán tỷ lệ sống của tế bào nấm men sau xử lý với benomyl. Chọn lọc những khuẩn lạc nấm men có màu sắc thay đổi so với chủng gốc theo hướng tăng sắc tố đỏ hoặc cam, sau đó nuôi cấy trên môi trường lỏng Hansen trong 96 giờ ở nhiệt độ  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , lắc 200 vòng/phút rồi đem đi xác định hàm lượng astaxanthin và sinh khối tế bào.

### 2.3. Xác định đường cong tăng trưởng và thời điểm thu nhận astaxanthin thích hợp của chủng nấm men đột biến

Đồ thị tương quan tuyến tính được xây dựng dựa trên giá trị mật độ quang ở bước sóng 610 nm ( $\text{OD}_{610\text{nm}}$ ) và log N/ml mật độ tế bào nấm men [12]. Huyền phù nấm men được tiến hành pha loãng thành các dung dịch có độ đục đo ở  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  theo một dãy các giá trị từ 0,1 đến 1,0 với độ tăng là 0,1. Từ các dung dịch có độ đục như trên, pha loãng và dùng buồng đếm hồng cầu để đếm số lượng tế bào nấm men. Tính mật độ tế bào (N/ml) và dựng đồ thị đường cong tăng trưởng giữa giá trị  $\text{OD}_{610\text{nm}}$  và log N/ml mật độ tế bào.

Cho vào 100 ml môi trường lỏng Hansen dịch tế bào nấm men lỏng và nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở điều kiện nhiệt độ  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Sinh khối nấm men thu được sau ly tâm đem sấy khô đến khối lượng không đổi ở từng giai đoạn

tăng trưởng gồm pha log, cuối pha log, đầu pha ổn định, pha ổn định và pha suy vong. Sau đó astaxanthin thu nhận từ sinh khối khô được đem đi xác định hàm lượng astaxanthin.

#### 2.4. Xác định tỷ lệ sống sót của tế bào nấm men

Tỷ lệ tế bào nấm men *R. toruloides* sống sót được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống sót} = (C_T/C_N) \times 100 \quad (1)$$

trong đó,  $C_T$  là tổng số tế bào đếm được sau khi xử lý với tác nhân benomyl;  $C_N$  là tổng số tế bào đếm được của mẫu đối chứng (mẫu không xử lý với tác nhân benomyl).

#### 2.5. Xác định khối lượng sinh khối

Các chủng nấm men *R. toruloides* đã đột biến bằng benomyl được nuôi lắc 200 vòng/phút trong môi trường lỏng Hansen, ở nhiệt độ  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  trong thời gian 96 giờ. Sau 96 giờ nuôi cấy, sinh khối nấm men được thu nhận bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút, trong thời gian 7 phút, loại bỏ môi trường nuôi cấy. Sinh khối tế bào đem rửa hai lần với nước cất rồi đem ly tâm 7 phút với tốc độ 6000 vòng/phút, sinh khối nấm men *R. toruloides* đột biến được sấy ở  $60^\circ\text{C}$  đến khi không đổi khối lượng. Khối lượng sinh khối nấm men khô được tính theo đơn vị g/l và được sử dụng để định lượng astaxanthin [13].

#### 2.6. Tách chiết và xác định hàm lượng astaxanthin

Phương pháp tách chiết và astaxanthin được xác định hàm lượng dựa trên phương pháp của T.J. Fang và cs (1993) [14], A. Nagy và cs (1997) [15] và có chỉnh sửa cho phù hợp với thí nghiệm. Sinh khối khô đã nghiền nhuyễn rồi cân 0,2 g cho vào 3 ml DMSO (Dimethyl sulfoxide) ủ ở  $55^\circ\text{C}$  trong 30 phút. Vortex 1 phút, ly tâm trong thời gian 7 phút với tốc độ 6000 vòng/phút, thu dịch bên trên chứa DMSO. Chiết với acetone vài lần cho đến khi phần lắng không còn sắc tố bằng cách cho 5 ml acetone vào phần cặn thu được, vortex rồi ly tâm trong thời gian 7 phút với tốc độ 6000 vòng/phút, thu dịch bên trên. Dịch chiết acetone được gộp chung với dịch nổi chứa DMSO, bổ sung ether dầu hỏa với tỷ lệ 1:2 so với tổng dịch chiết, cho thêm 10 ml nước cất, thêm 5 ml NaCl bão hòa nếu hỗn dịch không tách pha, thu pha ether dầu hỏa chứa sắc tố. Thêm nước với tỷ lệ 1:1 vào dịch chiết sắc tố, bỏ pha nước, thu pha ether dầu hỏa là dịch chiết có chứa sắc tố. Thực hiện 3-5 lần để loại bỏ dung môi DMSO hoàn toàn.

Dịch chiết chứa sắc tố được cho bay hơi hoàn toàn ở nhiệt độ  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , hòa tan dịch chiết sắc tố với 10 ml ether dầu hỏa. Mẫu được đem đo ở bước sóng 468 nm, sử dụng ether dầu hỏa làm mẫu đối chứng.

Tính hàm lượng astaxanthin ( $\mu\text{g/g}$ ) có trong mẫu theo C.E. Kelley và cs (1972) [16] như sau:

$$X = A_{468} \times V \times 10^4 / (E_{1\text{cm}} \% \times G) \quad (2)$$

trong đó,  $A_{468}$ : độ hấp thụ của mẫu trong dung môi ether dầu hỏa ở bước sóng 468 nm; V: thể tích mẫu (ml);

$E_{1\text{cm}} \%$ : độ hấp thụ của dung dịch astaxanthin 1% trong ether dầu hỏa (cuvette 1 cm) ( $E=2100$ ); G: khối lượng sinh khối *R. toruloides* (g).

#### 2.7. Khảo sát khả năng bắt gốc tự do ABTS<sup>+</sup> của astaxanthin

Hoạt động bắt gốc tự do của gốc cation ABTS<sup>+</sup> được xác định dựa theo phương pháp đã được công bố của R. Re và cs (1999) [17] với một số sửa đổi cho phù hợp với điều kiện thí nghiệm. Gốc tự do ABTS<sup>+</sup> được tạo ra trước bằng cách thêm 10 ml Kali persulfate 2,45 mM vào 10 ml ABTS<sup>+</sup> 7 mM và giữ trong 16 giờ ở nhiệt độ  $4^\circ\text{C}$  trong điều kiện tối (dung dịch stock). Dung dịch ABTS<sup>+</sup> được pha loãng trong methanol tuyệt đối từ dung dịch stock để đạt độ hấp thụ  $0,70 \pm 0,005$  ở bước sóng 734 nm. Để xác định hoạt tính bắt gốc tự do, dung dịch mẫu 1,5 ml ABTS<sup>+</sup> được trộn với các nồng độ mẫu khác nhau (0,5 m-, 0-25  $\mu\text{g/m}$ -), hỗn hợp phản ứng được lắc đều và giữ trong 6 phút ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ được ghi lại ở bước sóng 734 nm và phần trăm ức chế của các mẫu được tính như công thức sau:

$$\% \text{RSA} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs sample}} \times 100 \quad (3)$$

trong đó, % RSA: phần trăm ức chế; Abs control: độ hấp thụ của dung môi và ABTS<sup>+</sup> ở bước sóng 734 nm; Abs sample: độ hấp thụ của dung dịch mẫu và ABTS<sup>+</sup> ở bước sóng 734 nm. Vitamin E ở dãy nồng độ 20-100  $\mu\text{g/ml}$  được dùng làm mẫu đối chứng.

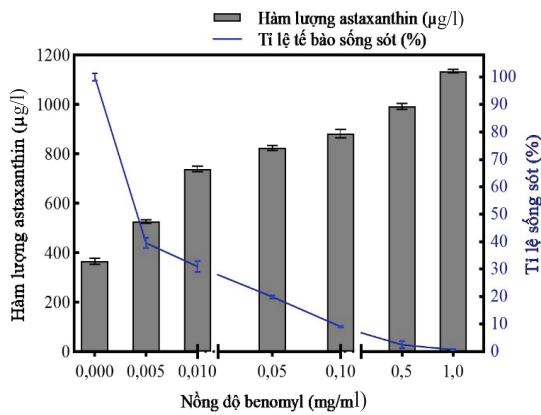
#### 2.8. Xử lý thống kê và phân tích dữ liệu

Trong nghiên cứu này, các số liệu thực nghiệm thực hiện với độ lặp 3 lần và được biểu thị bởi độ lệch chuẩn ( $\pm\text{SD}$  - Standard deviation). Phần mềm SAS phiên bản 8.2 (SAS institute, Cary, NC, Mỹ) được sử dụng để phân tích thống kê theo thuật toán ANOVA, Duncan test tại giá trị  $p < 0,05$ .

### 3. Kết quả và bàn luận

#### 3.1. Tạo chủng nấm men *R. toruloides* đột biến tăng cường sinh astaxanthin bằng benomyl

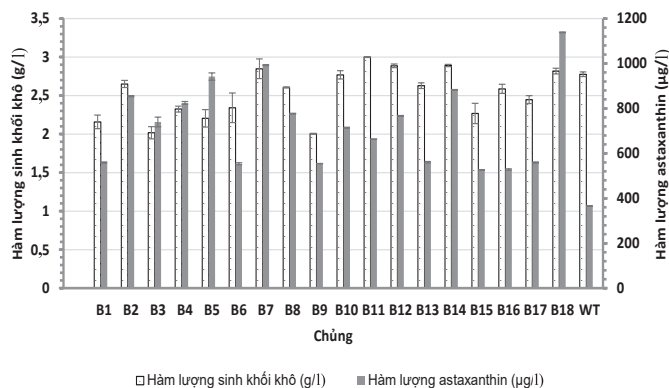
Sử dụng tác nhân benomyl ở các nồng độ khác nhau để gây đột biến trên chủng *R. toruloides* hoang dại, tiếp theo nuôi cấy trên môi trường thạch Hansen trong thời gian 7 ngày, ở điều kiện tránh sáng, để sàng lọc chủng có hàm lượng astaxanthin cao nhất. Sau quá trình xử lý với đột biến với tác nhân benomyl, các tế bào *R. toruloides* sẽ thay đổi màu sắc khuẩn lạc theo hướng tăng sắc tố (từ hồng cam đến đỏ) hoặc giảm sắc tố (từ hồng cam nhạt màu dần đến khuẩn lạc có màu trắng). Khuẩn lạc sau đột biến thu nhận được có hình dạng tròn, bề mặt trơn, một số khuẩn lạc có bề mặt nhám, hơi lồi và có hình chóp nón, một số khuẩn lạc có rìa bên ngoài màu đỏ nhạt. Sự thay đổi màu sắc của khuẩn lạc cho thấy việc xử lý đột biến với tác nhân benomyl có thể làm tăng hoặc giảm tổng hợp astaxanthin trong nấm men *R. toruloides*. Khi nồng độ benomyl tăng đã làm giảm tỷ lệ tế bào *R. toruloides* sống sót.



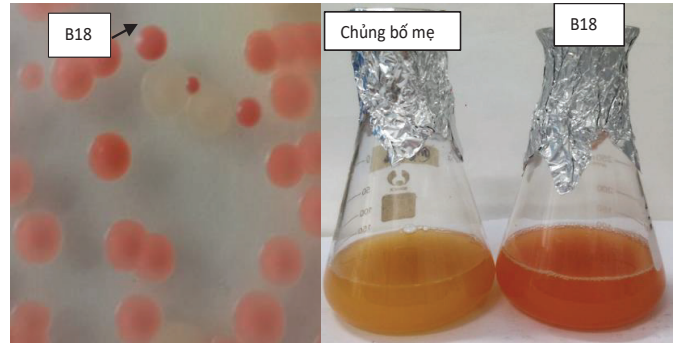
Hình 1. Nồng độ benomyl ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào sống sót của chủng nấm men *R. toruloides* VN1.

Ở hình 1 kết quả cho thấy, tỷ lệ chủng nấm men *R. toruloides* hoang dại ban đầu sống sót đã giảm đáng kể khi tăng nồng độ benomyl nhưng đồng thời sự tích trữ astaxanthin trong tế bào cũng tăng lên. Kết quả này chỉ ra rằng, việc tăng sản xuất astaxanthin giúp tế bào nấm men tăng cường khả năng bảo vệ các tế bào chống lại tác nhân gây chết tế bào [18].

Sau khi tiến hành đột biến, 150 khuẩn lạc đột biến đã được chọn lọc dựa vào màu sắc từ các đột biến ngẫu nhiên để nuôi cấy tăng sinh. Trong đó, tuyển chọn được 18 chủng có khả năng tăng cường sản xuất astaxanthin và thể hiện khối lượng sinh khối, hàm lượng astaxanthin cao hơn đáng kể so với chủng *R. toruloides* hoang dại (hình 2). Trong 18 chủng đột biến được tuyển chọn, chủng B18 ghi nhận hàm lượng astaxanthin cao nhất ( $1138,51 \pm 36,80 \mu\text{g/l}$ ) (hình 3). Benomyl là một trong những loại thuốc diệt nấm được sử dụng nhiều nhất chống lại các loại nấm và nấm gây bệnh [19]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, benomyl ngăn cản quá trình nguyên phân và giảm phân của tế bào từ đó ảnh hưởng đến quá trình sinh sản của tế bào nấm và làm giảm mật độ tế bào, ảnh hưởng đến sự sống sót của tế bào nghiêm trọng [19]. Kết quả thí nghiệm cho thấy, tế bào *R. toruloides* nhạy cảm với tác nhân benomyl và có khả năng tạo ra các chủng nấm men đột biến cho việc thích ứng với các stress khi tiếp xúc với benomyl.



Hình 2. Các chủng nấm men đột biến bằng benomyl sau 96 giờ nuôi cấy.

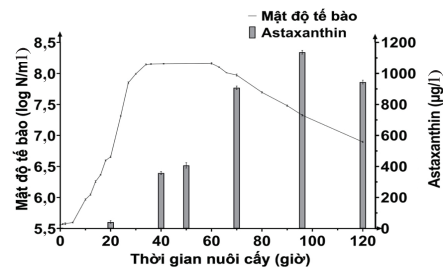


Hình 3. Màu sắc khuẩn lạc và môi trường nuôi cấy (Hansen lỏng) sau 96 giờ của chủng đột biến B18.

Hàm lượng astaxanthin của chủng B18 cao hơn 3,1 lần so với chủng bố mẹ (chủng WT). Một số nghiên cứu cho kết quả tương tự nghiên cứu này là các thí nghiệm trên nấm men *P. rhodozyma* của P. Calo và cs (1995) [20]; S. Barbara (2013) [11]. Hàm lượng astaxanthin trong tế bào nấm men *P. rhodozyma* sau đột biến với benomyl tăng gấp 2 lần theo tác giả P. Calo và cs (1995) [20] (từ 357,9 lên 750,2  $\mu\text{g/g}$ ) và 1,5 lần theo S. Barbara (2013) [11] (từ 0,93 lên 1,51  $\text{mg/l}$ ). Ngoài benomyl thì NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) cũng là hoá chất có khả năng gây đột biến nấm men tăng sinh astaxanthin. J.H. Kim và cs (2004) [21] khi gây đột biến nấm men *Xanthophyllomyces dendrorhous* bằng NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) cũng chọn lọc được chủng JH1 có khả năng sinh tổng hợp 4,032  $\text{mg}$  astaxanthin/g nấm men khô, gấp 15 lần so với chủng hoang dại.

### 3.2. Đường cong tăng trưởng và thời điểm thích hợp thu nhận astaxanthin của chủng B18 đột biến

Trong các chủng được sàng lọc, lựa chọn chủng có khả năng sinh astaxanthin cao nhất để xác định đường cong tăng trưởng và thời điểm thu nhận thích hợp astaxanthin (hình 4). Pha lag kéo dài trong 5 giờ đầu khi bắt đầu nuôi cấy, pha log diễn ra trong 33 giờ nuôi cấy sau đó đi vào pha ổn định (cân bằng), pha ổn định kéo dài trong vòng 30 giờ và sau 63 giờ nuôi cấy chủng B18 bắt đầu vào pha suy vong. Sau khi kết thúc pha log, hàm lượng astaxanthin tăng lên rõ rệt, tích lũy nhiều hơn ở pha ổn định và tăng đáng kể vào pha suy vong. Thời điểm tốt nhất để thu nhận astaxanthin là vào cuối pha ổn định bắt đầu pha suy vong, sau thời gian nuôi cấy là 70 giờ và đạt cực đại sau 96 giờ nuôi cấy, thời điểm này sinh khối đạt giá trị cao nhất và sự tích lũy astaxanthin cao nhất với hàm lượng là 1138  $\mu\text{g/l}$ .



Hình 4. Đường cong tăng trưởng và thời điểm thu nhận astaxanthin của chủng B18.

Chủng B18 cho thấy khả năng thích ứng nhanh trong môi trường nuôi cấy khi chỉ trải qua 5 giờ của pha lag, thời gian pha log của các chủng đã đột biến tương đối dài, tạo tiềm năng thu nhận được khối lượng sinh khối lớn. Theo kết quả này, chủng B18 đã đột biến cũng bắt đầu tích lũy astaxanthin từ cuối pha lag, tăng nhanh ở pha ổn định (cân bằng) và đạt tối đa ở pha suy vong sau 96 giờ nuôi cấy. Astaxanthin là nhóm hợp chất trao đổi bậc hai có vai trò làm sạch các gốc tự do, chống oxy hóa tế bào [22]. Do vậy, nấm men chỉ tích lũy nhiều astaxanthin khi quần thể tế bào bắt đầu đi vào pha ổn định và pha suy tàn, để bảo vệ tế bào tránh khỏi tác động từ các gốc tự do, tăng khả năng chống chịu và duy trì sự sống cho tế bào khi điều kiện môi trường dần trở nên bất lợi. Trong công bố của L.M.C. Matiz và cs (2015) [23] về sự sinh trưởng của chủng nấm men *X. dendrorhous* hoang dại và đột biến XR4 cũng cho thấy sự sinh tổng hợp của carotenoid bắt đầu từ pha cân bằng, sau đó tăng ở cuối pha cân bằng và vào pha suy vong sau khoảng 87 giờ nuôi cấy.

### 3.3. Khả năng kháng oxy hóa của astaxanthin thu nhận từ chủng B18 đột biến

Astaxanthin có khả năng kháng oxy hóa mạnh là do có cấu trúc phân tử đặc biệt, bao gồm 1 nhóm hydroxyl -OH và 1 nhóm ketone =O trên vòng  $\beta$ -ionone. Trong nghiên cứu này, cao chiết thô astaxanthin sau khi tách chiết thu nhận được tiến hành đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp ABTS. ABTS là gốc tự do tương đối ổn định với màu xanh đậm khi hòa tan trong dung môi và màu sắc của chúng được hấp thụ mạnh ở bước sóng 734 nm. Các chất hòa tan trong thử nghiệm ABTS sẽ chuyển thành màu xanh nhạt hơn khi chất chống oxy hóa loại bỏ ABTS về dạng ổn định bằng cách cho hydro vào [17].

**Bảng 1. Giá trị  $IC_{50}$  của vitamin E và cao chiết thô astaxanthin theo phương pháp ABTS.**

	Giá trị $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Vitamin E	52,64 $\pm$ 0,91
Cao chiết thô astaxanthin	8,531 $\pm$ 1,01

Bảng 1 cho thấy, khả năng bắt gốc tự do ABTS của cao chiết thô astaxanthin thể hiện khá mạnh mẽ với giá trị  $IC_{50}$  là 8,531 $\pm$ 1,01 ( $\mu\text{g/ml}$ ), trong khi đó hoạt tính kháng oxy hóa của chất đối chứng là vitamin E,  $IC_{50}$  là 52,64 $\pm$ 0,91 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Theo phương pháp ABTS thì giá trị  $IC_{50}$  của cao chiết thô astaxanthin thấp hơn 6,2 lần so với mẫu vitamin E đối chứng. Cao chiết thô astaxanthin thu được từ chủng nấm men *R. toruloides* B18 đột biến cũng cho thấy khả năng kháng oxy hóa tốt hơn so với các carotenoid khác [24]. Bằng phương pháp ABTS, S. Chintong và cs (2019) [25] nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết astaxanthin từ vỏ tôm cho kết quả khả quan với giá trị  $IC_{50}$  là 7,7 $\pm$ 0,6  $\mu\text{g/ml}$ , gần tương đồng như kết quả của nghiên cứu này ( $IC_{50}$  là 8,531 $\pm$ 1,01 ( $\mu\text{g/ml}$ )). Các tác giả khác đã công bố rằng, trong

dung dịch astaxanthin thoát ra ở trạng thái cân bằng, phụ thuộc vào dung môi, với dạng enol của ketone dẫn đến hệ thống polyene liên hợp và *ortho*-dihydroxyl có một nguyên tử hydro có khả năng hoạt động như một tác nhân phá vỡ chuỗi phản ứng gốc tự do theo cách tương tự như nhóm hydroxyl của vitamin E để giải thích khả năng kháng oxy hóa cao của astaxanthin so với các carotenoid khác [18]. Với năng lực kháng oxy hóa vượt trội cùng với cấu trúc đặc biệt đã giúp astaxanthin có thể nằm trong màng tế bào, kết quả bắt gốc tự do ABTS<sup>+</sup> là tiền đề cho các nghiên cứu liên quan đến việc chống lại các tác nhân stress, oxy hóa lipid, protein trên màng tế bào là nguyên nhân gây ra các bệnh lão hóa.

## 4. Kết luận

Kết quả này đã tạo ra các chủng nấm men *R. toruloides* đột biến bằng tác nhân benomyl có khả năng tăng cường sinh astaxanthin và các chủng đột biến được sàng lọc thu nhận được tích lũy astaxanthin cao hơn so với chủng nấm men *R. toruloides* ban đầu. Trong 18 chủng được lựa chọn, chủng B18 đột biến bằng benomyl cho hàm lượng astaxanthin cao nhất (1138,51  $\mu\text{g/l}$ ). Thời điểm thu nhận astaxanthin thích hợp nhất là 96 giờ nuôi cấy, lắc 200 vòng/phút, 30 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ , tỷ lệ giống ban đầu là 5%. Cao chiết astaxanthin thô được tách chiết từ chủng B18 đột biến có khả năng dập tắt gốc tự do ABTS ( $IC_{50}$ =8,531  $\mu\text{g/ml}$ ) cao gấp 6,2 lần so với vitamin E.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F.J. Pashkow, D.G. Watumull, C.L. Campbell (2008), "Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease", *The American Journal of Cardiology*, **101(10A)**, pp.58D-68D, DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.02.010.
- [2] T.H.P. Brotosudarmo, L. Limantara, E. Setiyono (2020) "Structures of astaxanthin and their consequences for therapeutic application", *International Journal of Food Science*, DOI: 10.1155/2020/2156582.
- [3] C. Galasso, I. Orefice, P. Pellone, et al. (2018), "On the neuroprotective role of astaxanthin: New perspectives?", *Marine Drugs*, **16(8)**, DOI: 10.3390/md16080247.
- [4] W. Jiang, H. Zhao, L. Zhang, et al. (2020), "Maintenance of mitochondrial function by astaxanthin protects against bisphenol A-induced kidney toxicity in rats", *Biomedicine*, **121**, DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109629.
- [5] Y. Wu, P. Yan, X. Liu, et al. (2019), "Combinatorial expression of different  $\beta$ -carotene hydroxylases and ketolases in *Escherichia coli* for increased astaxanthin production", *Journal of Industrial Microbiology*, **46(11)**, pp.1505-1516, DOI: 10.1007/s10295-019-02214-1.
- [6] Y.K. Park, J.M. Nicaud, R.L. Amaro (2018), "The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications", *Trends in Biotechnology*, **36(3)**, pp.304-317, DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.10.013.

- [7] H.J.S. Lopes, N. Bonturi, E.J. Kerkhoven, et al. (2020), “C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **104**(6), pp.2639-2649, DOI: 10.1007/s00253-020-10386-5.
- [8] Z. Wen, S. Zhang, C.K. Odoh, et al. (2020), “*Rhodospiridium toruloides* - A potential red yeast chassis for lipids and beyond”, *FEMS Yeast Research*, **20**(5), DOI: 10.1093/femsyr/foaa038.
- [9] X. Zhuang, O. Kilian, E. Monroe, et al. (2019), “Monoterpene production by the carotenogenic yeast *Rhodospiridium toruloides*”, *Microbial Cell Factories*, **18**(1), pp.1-15, DOI: 10.1186/s12934-019-1099-8.
- [10] D.N. Ngo, T.P.K. Bui, D.L.T. Mai, et al. (2014), “Screening some strains of microorganisms isolated from the Southeast region in Vietnam that have the ability to biosynthesize astaxanthin”, *Journal of Science and Technology*, **52**, pp.502-507 (in Vietnamese).
- [11] S. Barbara (2013), “Efficiency of selected mutagens in generating *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains hyperproducing astaxanthin”, *Polish Journal of Microbiology*, **62**(1), pp.67-72.
- [12] T.L.V. Khanh, T.V.T. Hong, D.N. Nghiep (2015), “Investigation of astaxanthin production from yeast *Rhodospiridium* sp.”, *British Microbiology Research Journal*, **9**(5), pp.1-7, DOI: 10.9734/BMRJ/2015/19368.
- [13] T.N. Tran, D.H. Ngo, Q.T. Tran, et al. (2020), “Enhancing astaxanthin biosynthesis by *Rhodospiridium toruloides* mutants and optimisation of medium compositions using response surface methodology”, *Processes*, **8**(4), DOI: 10.3390/pr8040497.
- [14] T.J. Fang, Y.S. Cheng (1993), “Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimisation of culture conditions”, *Journal of Fermentation*, **75**(6), pp.466-469, DOI: 10.1016/0922-338X(93)90099-T.
- [15] A. Nagy, Z. Palágyi, L. Ferenczy, et al. (1997), “Radiation-induced chromosomal rearrangement as an aid to analysis of the genetic constitution of *Phaffia rhodozyma*”, *FEMS Microbiology Letters*, **152**(2), pp.249-254, DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10435.x.
- [16] C.E. Kelley, A.W. Harmon (1972), “Method of determining carotenoid contents of Alaska pink shrimp and representative values for several shrimp products”, *Fishery Bulletin*, **70**(1), pp.111-113.
- [17] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, et al. (1999), “Antioxidant activity applying a improve ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radical Biology & Medicine*, **26**(9-10), pp.1231-1237, DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
- [18] H. Sigrun (1991), “Influence of fungicides on fungal fine structure”, *Electron Microscopy of Plant Pathogens*, pp.317-331, DOI: 10.1007/978-3-642-75818-8\_24.
- [19] V. Chiochio, N. Venedikian, A.E. Martinez, et al. (2000), “Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*”, *International Microbiology: The Official Journal of The Spanish Society for Microbiology*, **3**(3), pp.173-175.
- [20] P. Calo, T.D. Miguel, J.B. Velázquez, et al. (1995), “Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*”, *Biotechnology Letters*, **17**(6), pp.575-578, DOI: 10.1007/BF00129380.
- [21] J.H. Kim, C.W. Kim, H.I. Chang (2004), “Screening and characterization of red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutants”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **14**(3), pp.570-575.
- [22] W.A. Schroeder, E.A. Johnson (1995), “Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage”, *Journal of Industrial Microbiology*, **14**(6), pp.502-507, DOI: 10.1007/BF01573965.
- [23] L.M.C. Matiz, A.B. Torres, T.P. Noyola, et al. (2015), “Carotenoid production and gene expression in an astaxanthin-overproducing *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant strain”, *Archives of Microbiology*, **197**(10), pp.1129-1139, DOI: 10.1007/s00203-015-1153-9.
- [24] W. Miki (1991), “Biological functions and activities of animal carotenoids”, *Pure and Applied Chemistry*, **63**(1), pp.141-146.
- [25] S. Chintong, W. Phatvej, U.R. Am, et al. (2019), “In vitro antioxidant, antityrosinase, and cytotoxic activities of astaxanthin from shrimp waste”, *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, **8**(5), DOI: 10.3390/antiox8050128.